

Paris 1969

ORSAY

Série A, N°

N° D'ordre : 434

Sujet de la Thèse

PURIFICATION ET PROPRIETES DE LA TOXINE

ERYTHROGENE DU STREPTOCOQUE

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences
Naturelles enregistrée au C.N.R.S. sous le n° A.O.2707

NAUCIEL Charles

Soutenue le 7.1.1969 à la Faculté des Sciences d'Orsay

devant le jury :

MM. LEDERER Président

DUBERT

Mme LABOUESSE

M. RAYNAUD



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Juin 1968, Tome 114.)

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS
DE LA TOXINE ÉRYTHROGÈNE DU STREPTOCOQUE

PAR

C. NAUCIEL, M. RAYNAUD et B. BIZZINI

MASSON ET C^{IE}, EDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS



PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS
DE LA TOXINE ÉRYTHROGÈNE
DU STREPTOCOQUE

PAR

C. NAUCIEL, M. RAYNAUD et B. BIZZINI

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* ».
(N° d'ordre 4360. — Extrait Juin 1968. — Tome **114**, pp. 796-811.)

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE ÉRYTHROGÈNE DU STREPTOCOQUE (*)

par C. NAUCIEL, M. RAYNAUD et B. BIZZINI (**) (***)

(*Institut Pasteur, Service d'Immunochimie, Garches*)

INTRODUCTION

Les streptocoques du groupe A excrètent d'une part des enzymes et d'autre part des toxines qui sont probablement responsables de la place importante que ces germes tiennent en pathologie.

Parmi les toxines, la toxine érythrogène est la seule dont le rôle est bien connu : elle est la cause de la scarlatine.

Nous rapportons, dans le présent travail, la méthode que nous avons mise au point pour la purifier et diverses propriétés physico-chimiques et immunologiques de la préparation ainsi obtenue.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — PRODUCTION DE LA TOXINE ÉRYTHROGÈNE

La souche de streptocoque utilisée est la souche n° 594 qui nous a été fournie par le Dr J. A. Comb, *Department of Public Health, Jamaica Plain, Mass., U. S. A.*

La toxine a été produite par lots de 50 l.

Le milieu de culture a été préparé de la manière suivante : dans un volume d'environ 2 l d'eau distillée on dissout :

- 750 g de peptone pancréatique (Organotechnie),
- 750 g de peptone pepsique (Réactifs),
- 250 g de peptone pancréatique de levure (Réactifs).

Cette préparation est mise à dialyser, à + 4°, contre 20 l d'eau distillée. La dialyse est renouvelée au bout de vingt-quatre heures. Le dialysat est recueilli. Son volume est complété à 50 l avec de l'eau distillée. On

(*) Travail effectué avec l'aide de l'I. N. S. E. R. M.

(**) Manuscrit reçu le 4 décembre 1967.

(***) Ce travail fait partie d'une thèse de Doctorat à soutenir par C. Nauciel à la Faculté des Sciences.

ajoute 32 ml d'une solution de cystine à 20 p. 100 (en HCl 2 N) et 20 ml d'une solution alcoolique de rouge de phénol à 1 p. 100. Le pH est ajusté à 7,5 avec de la lessive de soude. On introduit ensuite 300 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 12 H_2O et 35 g de KH_2PO_4 . Le milieu est réparti dans 12 flacons de 5 l, à raison de 4 l par flacon. Le reste est utilisé pour la préculture. Le milieu est stérilisé à l'autoclave (trente minutes à 115°). Au moment de l'ensemencement, on ajoute dans chaque flacon une solution de NaHCO_3 à 10 p. 100 (stérilisée par passage sur un filtre Seitz) de manière à obtenir une concentration finale de 2 g/l et une solution de glucose à 50 p. 100 (stérilisée à l'autoclave : quarante minutes à 105°) de manière à obtenir une concentration finale de 15 g/l.

CONDITIONS DE CULTURE :

La souche est conservée à + 4° en gélatine nutritive (Serpasteur). Au moment de l'emploi la souche est ensemencée sur 30 ml du milieu précédemment décrit. Après vingt-quatre heures d'incubation à 37°, la culture est centrifugée, le surnageant éliminé. Le culot est ensemencé sur 4 flacons de 500 ml du même milieu. Après vingt-quatre heures de séjour à 37°, cette préculture est répartie à raison de 100 ml par flacon de 4 l.

La culture est poursuivie quarante-huit heures à 37°. L'acidification du milieu est indiquée par le virage du rouge de phénol. Plusieurs neutralisations avec de la soude 5 N sont effectuées. La culture est arrêtée par adjonction de merthiolate à la concentration de 1 p. 10 000. Les germes sont éliminés au moyen d'une centrifugeuse Sharples. On obtient ainsi la toxine brute (stade 1).

II. — PURIFICATION DE LA TOXINE

La toxine brute est concentrée, à + 4°, par ultrafiltration à travers des bougies enduites de parlodion à 8 p. 100. Cette méthode est décrite en détail dans la thèse de E. H. Relyveld [18].

La préparation obtenue (stade 2) est additionnée de sulfate d'ammonium solide, à raison de 485 g/l de solution initiale (soit 0,75 de saturation à + 4°). Le pH est ajusté à 6 avec de l'ammoniaque. Après quarante-huit heures de séjour à + 4°, le précipité est recueilli par centrifugation et redissous dans environ 50 ml de tampon phosphate mono-dipotassique 0,002 M de pH 6,8. La solution est dialysée contre ce même tampon jusqu'à élimination du sulfate d'ammonium (stade 3). Elle est alors introduite sur une colonne (30 × 2 cm) de *DEAE-cellulose* (marque WHATMAN, chromedia DE 11, 1 mEq/g), équilibrée au préalable en tampon phosphate 0,002 M, pH 6,8. L'élution est faite avec 150 ml de ce même tampon, puis avec 200 ml de tampon 0,05 M, pH 6,8.

L'effluent est recueilli par fractions de 7,5 ml. Les densités optiques sont mesurées à 277 mμ. La toxine érythroène se trouve dans le deuxième pic. Le mélange des effluents de ce pic est dialysé contre de l'eau distillée, lyophilisé, puis repris dans quelques ml de tampon phosphate 0,05 M pH 6,8 (stade 4).

Cette préparation est introduite, par fraction de 30 à 40 mg, sous un volume de 2 ml, sur une colonne de Sephadex G-100 équilibrée en

tampon phosphate 0,05 M pH 6,8. On utilise des colonnes Pharmacia de 2,5 cm de diamètre. La hauteur du gel est de 40 cm. L'élution est faite à l'aide de tampon phosphate 0,05 M, pH 6,8. L'effluent est recueilli par fractions de 5 ml. On observe un seul pic principal qui est dialysé contre de l'eau distillée, puis lyophilisé (stade 5).

III. — TITRAGE BIOLOGIQUE DE LA TOXINE

Il est effectué sur des lapins gris de race chinchilla. Les préparations de toxine sont diluées dans une solution contenant : NaCl 0,9 p. 100, NaHCO_3 0,1 p. 100 et gélatine 0,02 p. 100. Les injections sont faites par voie intradermique, sous un volume de 0,1 ml au voisinage de l'échine. Les réactions sont lues à la vingt-quatrième heure. La dose test cutanée (DTC) est la quantité de toxine la plus faible qui provoque un érythème d'au moins 10 mm de diamètre. Plusieurs animaux sont utilisés simultanément. Les animaux donnant de mauvaises réactions sont éliminés. Cette méthode de titrage est peu précise. La marge d'erreur est de l'ordre de 50 p. 100.

IV. — ETUDE IMMUNOLOGIQUE

1° SÉRUMS.

a) Le sérum *étalon* antiscarlatineux a été fourni sous forme lyophilisée par le *Statens Serum Institut* de Copenhague (10 000 U. par ampoule).

b) Avec de la toxine concentrée (stade 3) adsorbée sur phosphate de calcium [47] et titrant 10^7 doses tests cutanées par ml, un cheval a subi 3 séries d'injections par voie intramusculaire (tableau I).

TABLEAU I. — Immunisation du cheval 830 : injection intramusculaire, bihebdomadaire d'un vaccin contenant 10^7 DTC/ml.

	INJECTIONS (ml)						
	1 ^{re}	2 ^e	3 ^e	4 ^e	5 ^e	6 ^e	7 ^e
Novembre 1964	1	2	3	5	10		
Janvier 1965	1	2	3	5	10	10	15
Juillet 1965	3	10	20				

Une grande saignée a été opérée dix jours après la dernière injection de vaccin (sérum 90229).

2° TITRAGE DU POUVOIR NEUTRALISANT DU SÉRUM.

Détermination de la dose LI de toxine :

A une unité internationale de sérum étalon on ajoute des quantités croissantes de toxine purifiée (stade 4). Le volume final est de 1 ml. Après une heure de contact à la température ambiante, on injecte 0,1 ml du mélange à des lapins chinchilla.

La lecture est faite à la vingt-quatrième et à la quarante-huitième heure. La dose Lr est de 4 000 DTC en moyenne, mais il existe une certaine dispersion des résultats selon les animaux.

Titration du sérum 90229 :

A une dose Lr, on ajoute des dilutions croissantes de sérum 90229.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la détermination de la dose Lr. La première dilution donnant une réaction égale à celle obtenue avec le mélange d'une unité internationale et de la dose Lr permet de déterminer le titre du sérum. Il est important de contrôler simultanément, sur le même animal, la valeur de la dose Lr avec le sérum étalon.

3° FLOCCULATION.

Elle est effectuée suivant la méthode de Ramon. A une quantité fixe de toxine sous un volume de 0,25 ml, on ajoute des quantités croissantes de sérum. Les tubes sont incubés dans un bain-marie à 45°. Le calcul des titres flocculants s'effectue suivant les conditions indiquées dans le chapitre des résultats.

4° COURBE DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE.

A 1 ml de sérum 90229, on ajoute sous un volume de 1 ml des quantités croissantes de toxine purifiée (stade 4) dissoute en tampon phosphate isotonique pH 6,8. Après deux heures d'incubation à 37° et quarante-huit heures à + 4°, les tubes sont centrifugés quinze minutes à 10 000 t/mn.

Le surnageant est recueilli pour la recherche d'anticorps et de toxine par titrage *in vitro* et par précipitation en gel. Le précipité est lavé deux fois en tampon phosphate isotonique, dissous dans de la soude 0,1 N et recueilli pour le dosage d'azote.

Les résultats rapportés pour chaque point de la courbe correspondent à la moyenne de 2 déterminations expérimentales.

5° IMMUNODIFFUSION EN GEL.

Elles sont effectuées suivant les méthodes de double diffusion en boîte (Ouchterlony), de double diffusion en tube [14] et par immunodiffusion électrophorèse [5]. Pour cette dernière technique, on opère sur des plaques de verre de 9 × 12 cm en tampon véronal, pH 8,2, 0,05 M, et sous une tension de 5 v/cm, la durée de passage du courant étant de quatre-vingts minutes. Les plaques sont lavées, puis colorées au noir amide.

V. — ELECTROPHORÈSE

Elle a été pratiquée en gel d'acrylamide-agarose dans un tampon Tris-glycine pH 8,7 suivant la technique décrite par Uriel [24].

VI. — DOSAGES D'AZOTE

Ils ont été effectués par la méthode du micro-Kjeldahl.

VII. — EXPÉRIENCES DE DIGESTION ENZYMATIQUE

A 200 µg de toxine érythrogyène purifiée on a ajouté 15 µg de pepsine cristallisée (*Bios Laboratories, New York*) en tampon citrate 0,2 M pH 2,2. Le volume final était de 0,6 ml. L'activité biologique résiduelle a été mesurée après une heure d'incubation à 37°. La digestion trypsique a été effectuée dans des conditions identiques en utilisant 20 µg de trypsine deux fois cristallisée (*General Biochemical Inc. Chagrin Falls-Ohio, U. S. A.*) en tampon phosphate 0,2 M pH 7,6.

VIII. — SPECTRES D'ABSORPTION EN LUMIÈRE U. V.

Ils ont été établis à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Beckman, modèle DK.

IX. — ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

Elle a été pratiquée sur un appareil Beckman, modèle E afin de mesurer la constante de sédimentation et la masse moléculaire par la méthode d'Yphantis [27] (1).

X. — ANALYSE EN AMINO-ACIDES

Elle a été déterminée par la méthode de Spackman, Stein et Moore [49] à l'aide de l'appareil automatique Spinco, modèle M 120. Les détails techniques ont été décrits dans une publication de deux d'entre nous [46].

Les analyses ont été effectuées sur 3 lots différents de toxine purifiée. Les temps d'hydrolyse pour chaque analyse ont été de vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures afin de permettre les calculs d'extrapolation.

La détermination des résidus 1/2 cystine a été effectuée après oxydation performique, suivant la technique de Moore [43]. Le dosage du tryptophane a été effectué suivant la méthode de Harrison et Hofmann [6].

RÉSULTATS

I. — PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA TOXINE ÉRYTHROGÈNE

Le milieu de culture dialysable qui a été employé permet d'obtenir 300 000 DTC/ml. La masse bactérienne obtenue est de 0,4 g de poids sec par litre de culture. Les résultats des étapes de purification figurent dans le tableau II.

(1) Nous remercions R. Mangalo qui a bien voulu se charger de ces déterminations.

TABLEAU II. — Etapes de la purification (moyenne de 6 lots)

1 Lf de toxine = 25 000 DTC.

STADE		VOLUME (ml)	AZOTE TOTAL (mg)	E 0,1 % N 277 m μ	Lf /mg N	Lf TOTALES
1	Toxine brute.....	50.000	35.000	—	—	—
2	Ultra-filtration.....	1.000	1.000	—	600	600.000
3	Sulfate d'Ammonium .	50	80	—	6.000	480.000
4	DEAE-Cellulose.....	—	24	7,5	14.000	330.000
5	Sephadex G-100.....	—	14	9,00	19.000	260.000

Les protéines extra-cellulaires, précipitables par le sulfate d'ammonium, représentent environ 10 mg/l de culture et la toxine érythro-gène constitue environ 30 p. 100 de ces protéines.

Au stade 3, la toxine concentrée est encore très colorée. L'immuno-

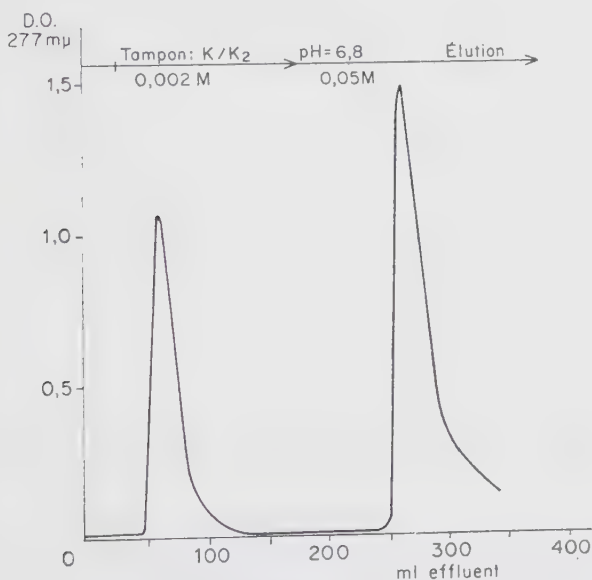


FIG. 1. — Chromatographie sur DEAE-cellulose de la toxine érythro-gène au stade 3.

électrophorèse et la double diffusion en tube contre le sérum 90229 mettent en évidence 6 constituants.

Après la chromatographie sur DEAE-cellulose, la préparation obtenue est incolore. Elle est déjà d'une grande pureté. Elle apparaît homogène à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation. On n'observe

qu'une ligne en immunoelectrophorèse. Ce n'est que par double diffusion en tube que l'on détecte une ligne de précipitation accessoire pour des concentrations supérieures à 1 mg/ml.

Après passage sur Sephadex G-100, l'activité spécifique est augmentée, et atteint 400 à 500 millions de DTC par mg N. En double diffusion en tube, il faut des concentrations supérieures à 3 mg/ml

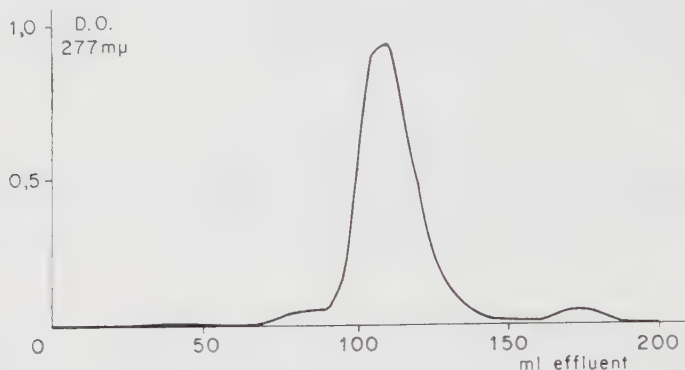


FIG. 2. — Chromatographie sur Séphadex G-100 (40 × 2,5 cm) de la toxine érythrogène au stade 4. Elution en K/K_2 0,05 M, pH 6,8.

pour percevoir une ligne accessoire très faible. La quantité de contaminant détectable par cette méthode paraît être inférieure à 1 p. 100.

II. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA TOXINE PURIFIÉE

Après lyophilisation, la toxine apparaît comme une poudre blanche dont les solutions sont incolores. Elle est peu sensible à l'action de la chaleur (tableau III).

TABLEAU III. — Effet de la température sur l'activité biologique de la toxine. La toxine à la concentration de 0,25 mg/ml en tampon phosphate pH 6,8, 0,02 M a été chauffée pendant une heure et la toxicité résiduelle a été mesurée chez le lapin.

TEMPÉRATURE DE CHAUFFAGE	TOXICITÉ RÉSIDUELLE
60°	100 %
70°	100 %
80°	100 %
90°	5 %
100°	1 %

Son activité biologique n'est pas modifiée par la trypsine, ni par la pepsine, après une heure de contact.

— Les caractéristiques de l'absorption en lumière U.V. sont représentées sur la figure 3 et dans le tableau IV.

— La constante de sédimentation S_{20} est de $2,52.10^{-13}$. Le poids

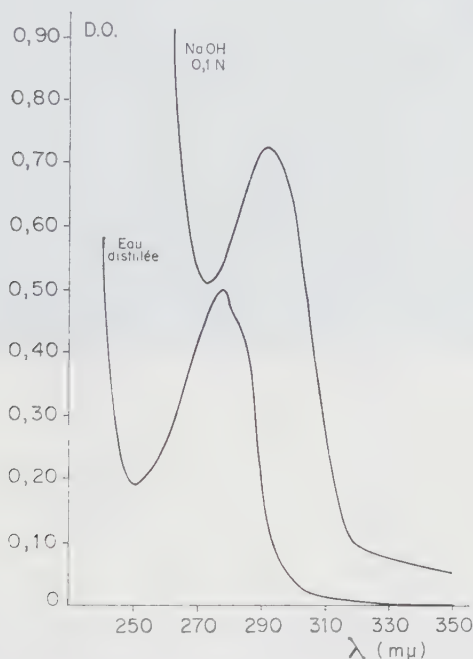


FIG. 3. — Spectre d'absorption en U.V. de la toxine érythroène purifiée (55 μ g N/ml).

TABEAU IV. — Absorption de la toxine érythroène en lumière U. V.

	MAXIMUM D'ABSORPTION	MINIMUM	0,1 % N E
En tampon phosphate pH 6,8 en eau distillée en HCl 0,1 N	277 mμ	250 mμ	0,1 % N E 277 mμ = 9,0
en NaOH 0,1 N	292 mμ	272 mμ	0,1 % N E 292 mμ = 12,3

TABLEAU V. — Analyse en aminoacides de la toxine érythroène.

	AMINO- ACIDES EN g p. 100 g DE PROTÉINES*	NOMBRE MINIMUM DE RÉSIDUS AA PAR MOLE	POIDS MOLECULAIRE MINIMUM BASÉ SUR N RÉSIDUS AA PAR MOLE	POURCENTAGE CORRIGÉ D'AMINO- ACIDES PAR MOLE**
Lysine	12,15	25	30025	12,13
Histidine	3,49	7	31024	3,61
Ammoniaque ..	2,69			
Arginine	2,11	4	32984	2,31
Tryptophane...	0,75	1	27200	0,67
Ac. Aspartique.	15,27	34	29614	15,03
Thréonine	6,07	15	29415	5,93
Sérine	5,71	16	29408	5,58
Ac. Glutamique	15,66	32	30048	15,64
Proline	4,58	12	30132	4,59
Glycine	3,60	14	29176	3,49
Alanine	1,84	6	29022	1,78
Valine	5,81	15	30195	5,83
Méthionine	1,68	3	26607	1,48
Isoleucine	5,93	14	30926	6,09
Leucine	9,52	22	30272	9,58
Tyrosine	11,32	19	30362	11,43
Phénylalanine..	5,25	10	31430	5,48
Cys-SO ₃ H	2,24	4	30176	2,25
TOTAL	112,98			112,90

* Les résultats représentent la moyenne de 3 analyses, exécutées à 3 temps d'hydrolyse (24 - 48 - 72 h).

Pour la lysine, la thréonine et la sérine, les valeurs ont été obtenues par extrapolation au temps 0. Pour la valine, la valeur est celle obtenue à 72 h. Le tryptophane et la cystéine ont été dosés séparément suivant les méthodes indiquées dans le texte. Une seule analyse a été effectuée.

** Correction faite en prenant pour base le poids moléculaire moyen de 30 083.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Double diffusion en tube contre le sérum 90229 de :

- 1° Toxine érythroène purifiée 70 Lf/ml ;
- 2° Toxine érythroène purifiée 700 Lf/ml ;
- 3° Toxine érythroène purifiée 7 000 Lf/ml ;
- 4° Toxine au stade 3 de purification :
5 000 Lf/ml.

FIG. 2. — Electrophorèse de la toxine purifiée, en gel d'acrylamide-agarose, en tampon tris-glycine pH 8,7 sous une tension de 10 volts/cm pendant deux heures.

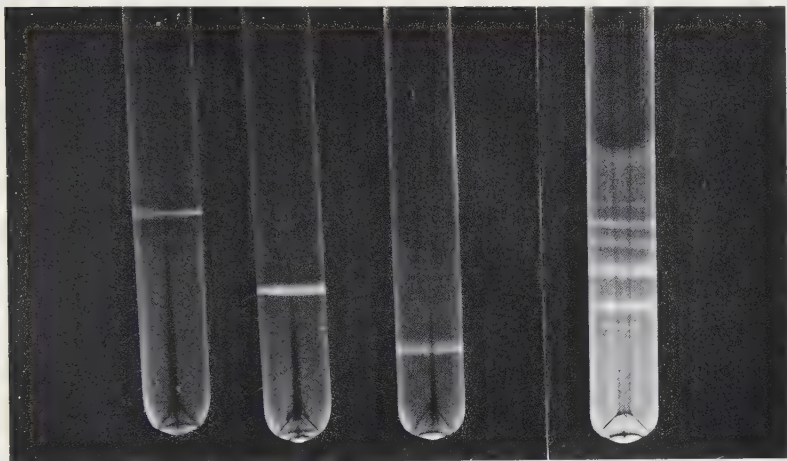


FIG. 1.

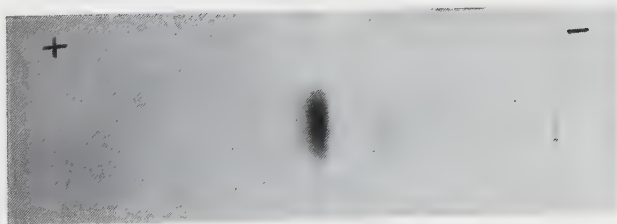


FIG. 2.

moléculaire déterminé par la méthode d'Yphantis est de 30 500 ($\pm 2,5$ p. 100).

— La composition en amino-acides figure dans le tableau V. Le poids moléculaire moyen calculé sur le nombre minimum d'acides par mole est de 30 083. (On n'a pas tenu compte dans ce calcul de l'arginine, de la méthionine, ni du tryptophane pour lesquels les valeurs trouvées sont trop dispersées par rapport à la moyenne).

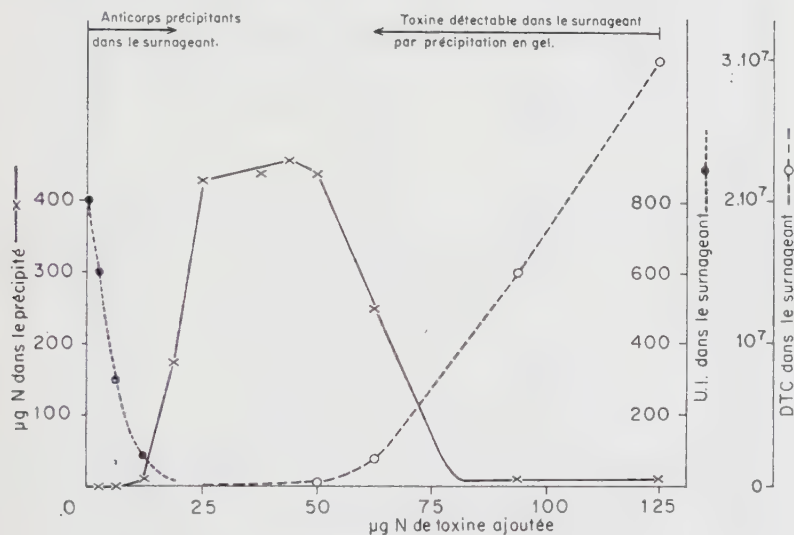


FIG. 4. — Courbe de précipitation quantitative obtenue avec le sérum 90229 (1 ml par tube).

III. — PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES

Le sérum 90229 obtenu par immunisation d'un cheval à l'aide d'une toxine brute concentrée contient des anticorps précipitants et des anticorps neutralisants.

La courbe de précipitation quantitative pratiquée avec de la toxine purifiée a donné les résultats qui figurent dans le tableau VI et la figure 4.

Cette courbe montre que le sérum contient 417 µg N d'anticorps par ml. On remarque un fait important qui est l'absence de neutralisation complète dans la zone d'équivalence. Ce point permet

TABLEAU VI. — Courbe de précipitation quantitative : sérum 90229 1 ml. Toxine érythroène purifiée en quantité croissante sous un volume de 1 ml.

TOXINE INTRODUITE		PRÉCIPITÉ				SURNAGEANT		
$\mu\text{g N}$	D.T.C.	$\mu\text{g N total}$ précipité	$\mu\text{g N Ac}$ précipité	N Ac N Ag	$\frac{A}{T}$ (2)	Toxine en excès	Anticorps en excès	U.I.
0	0	0	0			0	+	800
2,5	10^6	0	0			0	+	600
6,3	$2,5 \cdot 10^6$	0	0			0	+	300
12,7	$5 \cdot 10^6$	14				0	+	100
19	$7,5 \cdot 10^6$	175	156	8,2	1,6	0	+	40
25	10^7	430	405	16,2	3,2	0	0	0
38	$1,5 \cdot 10^7$	442	404	10,6	2,1	0	0	0
43	$1,75 \cdot 10^7$	460	417	9,7	1,9	0	0	0
50	$2 \cdot 10^7$	439				0	0	0
63,5	$2,5 \cdot 10^7$	250				+	0	0
95	$3,7 \cdot 10^7$	15				+	0	0
127	$5 \cdot 10^7$	15				+	0	0

(1) Rapport des taux d'azote de l'anticorps et de l'antigène dans le précipité.

(2) Nombre de molécules d'anticorps pour une molécule de toxine, dans le précipité (le poids moléculaire des anticorps étant estimé à 160 000).

d'expliquer la discordance observée entre le pouvoir floculant et le pouvoir neutralisant du sérum.

Le pouvoir neutralisant du sérum a été trouvé égal à 800 U. I. et l'unité de combinaison Lr correspond à 0,01 μg N de toxine (soit 4 000 DTC).

Si l'on admet arbitrairement et par définition que pour l'étalon provisoire de notre laboratoire (sérum 90229) une unité internationale est égale à une unité Lf de sérum, on trouve qu'une unité Lf de toxine correspond à 0,061 μg N (soit 25 000 DTC).

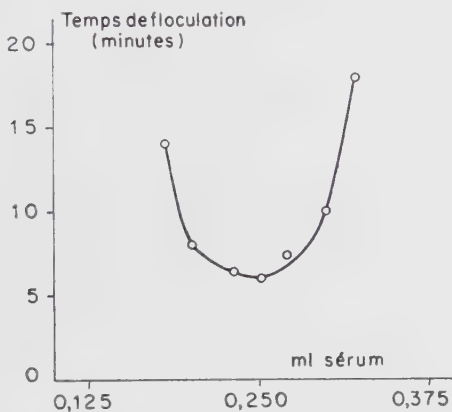


FIG. 5. — Floculation du sérum 90229 avec 12,2 μg N ($5 \cdot 10^6$ D.T.C.) de toxine érythroène sous un volume de 0,25 ml (à 45°).

La floculation s'observe rapidement si l'on opère à un niveau concentré. Le Kf est de six minutes à une concentration de 400 Lf/ml. Nous rapportons à titre d'exemple dans la figure 5 les résultats d'une expérience de floculation. Les titrages par floculation sont facilement reproductibles.

Précisons enfin, que l'analyse immunoélectrophorétique du sérum 90229 a permis de vérifier que les anticorps précipitants sont des γ -globulines rapides de type γA ou γG (T) (2).

(2) Cette immunoglobuline ou constituant T de Van der Scheer [25] longtemps considérée comme équivalente aux γA -immunoglobulines humaines est, d'après Weir et Porter [26], une variété proche des γG pour laquelle ces auteurs ont préconisé la dénomination de γG (T).

IV. — DÉTOXIFICATION PAR LE FORMOL

La toxine érythrogyène purifiée (stade 4) à la concentration de 1 mg/ml perd toute son activité biologique si elle est maintenue à 37° pendant trois semaines en présence de 4 volumes pour 1 000 de formol à 40 p. 100 et de bicarbonate de sodium à 1 p. 100. La préparation est additionnée également de merthiolate à la concentration de 1 p. 10 000.

Dans des conditions comparables un échantillon témoin sans formol, conserve toute son activité.

DISCUSSION

Plusieurs groupes de chercheurs ont déjà obtenu de la toxine érythrogyène à un haut degré de pureté en utilisant des méthodes de précipitation fractionnée [9, 10, 11, 12, 21]. L'activité spécifique de notre préparation est du même ordre de grandeur que celle des préparations obtenues par les auteurs précédents. L'imprécision du titrage ne rend pas les différences très significatives. La valeur du poids moléculaire est également voisine des valeurs déjà publiées : 26 700 et 29 000. En revanche, la composition en amino-acides de notre préparation est très différente de celle qu'a rapportée Kushko [11]. La raison de cette différence n'est pas connue.

La toxine donne avec un sérum de cheval hyperimmunisé une courbe de précipitation de type floculation, comme cela avait été montré par Hottle et Pappenheimer [8]. Nous avons trouvé comme ces auteurs qu'il persistait un peu de toxine libre (environ 1/1 000) dans le surnageant, dans la zone d'équivalence. Toutefois, contrairement à ces mêmes auteurs, nous avons trouvé, avec notre sérum, que la toxine était neutralisée dans la zone d'excès d'anticorps. La présence de toxine libre dans la zone d'équivalence explique la discordance entre le pouvoir neutralisant et le pouvoir floculant du sérum, fait qui a déjà été signalé [8, 15].

La toxine érythrogyène peut être transformée en *toxoid* sous l'effet du formol, comme l'avait déjà constaté Bepalova [3]. Cette propriété peut permettre d'envisager pour l'avenir la mise au point d'un vaccin antiscarlatineux. Bien que la scarlatine ait beaucoup perdu de sa gravité, sa fréquence et les incidences sociales que cela comporte pourraient justifier une telle vaccination sous réserve qu'elle se révèle efficace et sans danger.

Il existe des publications faisant mention de la pluralité des toxines érythrogènes. Comment peut-on situer, parmi ces diverses variétés, la toxine que nous avons purifiée ?

On considère habituellement comme toxine de référence, celle qui est sécrétée par la souche Dochez NY 5. C'est celle qui a été purifiée par Stock et par Kushko. Elle a été appelée toxine A par Hooker et Follensby [7]. La souche 594 que nous avons choisie en raison de son meilleur rendement, sécrète une toxine identique à celle de la souche NY 5 [8]. De plus, cette toxine est neutralisée par le sérum étalon international.

En injectant 10 000 DTC d'une préparation partiellement purifiée de toxine érythrogène, provenant de la souche NY 5, Stock a pu reproduire une scarlatine chez plusieurs sujets [20]. Nous avons de même pu reproduire une scarlatine chez un sujet de 17 kg avec 10 000 DTC de notre toxine purifiée (soit 0,02 µgN). Ces faits démontrent que la toxine A est responsable de la scarlatine.

Hooker et Follensby [7] ont décrit une autre toxine qu'ils ont appelée B et qui possède des propriétés physico-chimiques différentes de celles de la toxine A. Elle est en particulier sensible à la trypsine. La souche NY 5 sécrète également de la toxine B, mais sa fragilité fait que dans les conditions habituelles de culture elle est détruite au bout de vingt-quatre heures. La toxine B a été partiellement purifiée par Stock et Lynn [22] à partir d'autres souches.

La toxine B n'est pas neutralisée par un sérum anti-A. Elle est neutralisée mais non précipitée par un sérum anti-B [22]. Injectée par voie intradermique, elle provoque une réaction cutanée chez l'homme et chez le lapin [7, 22]. A notre connaissance, il n'a pas été produit de scarlatine expérimentale avec cette toxine.

Coffey [4] a étudié 597 souches de streptocoques. Elle a considéré comme toxinogènes les souches dont 0,01 ml de filtrat de culture donnait une réaction cutanée chez le lapin. Dans ces conditions, elle montre par l'étude du pouvoir neutralisant de différents immun-sérums qu'il existe 3 facteurs toxiques distincts.

Il nous paraît cependant hasardeux d'appeler toxine érythrogène une substance dont la seule propriété biologique connue est de provoquer un érythème localisé lorsqu'elle est injectée par voie intradermique. En effet, Teissier et Coste faisaient remarquer dès 1929 que des filtrats de culture de bactéries très diverses, même dilués, pouvaient donner des réactions de ce type [23]. Il faut noter également qu'Ando et coll. [1, 2] ont mis en évidence dans les filtrats de culture de streptocoques, à côté de la toxine érythrogène classique, une substance allergisante sensible à la trypsine. Etant donné le manque de spécificité des réactions cutanées locales, nous pensons qu'il faut définir la toxine érythrogène du streptocoque comme la toxine capable de produire une scarlatine expérimentale,

et cette définition ne peut s'appliquer pour le moment qu'à la substance qui a été appelée toxine A. Des études complémentaires sont nécessaires pour savoir si les toxines B et C qui donnent un érythème localisé sont capables de provoquer chez l'homme une scarlatine.

RÉSUMÉ

La toxine érythrogène du streptocoque a été purifiée par des méthodes de chromatographie sur colonne à partir du surnageant de culture de la souche 594.

La préparation obtenue est homogène à l'ultracentrifugation, à l'électrophorèse et à l'immunoélectrophorèse. Son poids moléculaire est de 30 500. Sa composition en amino-acides a été déterminée.

Elle est détoxifiable par le formol.

Un sérum de cheval hyperimmunisé a été étudié. Il donne avec la toxine purifiée une courbe de précipitation quantitative de type flocculation. La neutralisation n'est pas complète dans la zone d'équivalence, d'où un décalage entre le pouvoir neutralisant et le pouvoir flocculant du sérum.

SUMMARY

Erythrogenic toxin was purified from culture supernatant of *Streptococcus* (strain 594) by column chromatography.

The toxin is homogeneous as shown by ultracentrifugation, polyacrylamide — agarose gel electrophoresis and immunoelectrophoresis. The molecular weight is 30500. Amino acid analysis was carried out.

The toxin can be detoxified by formaldehyde.

Hyperimmune horse serum was prepared. The quantitative precipitin curve with purified toxin is of the flocculation type. Neutralization was not complete in the equivalence zone. This explains the discrepancy observed between neutralizing and flocculating power of the serum.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDO (K.), KURAUCHI (K.) and NISHIMURA (H.). *J. Immunol.*, 1930, **18**, 223.
- [2] ANDO (K.) and NISHIMURA (J.). *J. Immunol.* 1930, **18**, 257.
- [3] BESPALOVA (M. V.), *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 1955, **9**, 58.
- [4] COFFEY (J. M.). *J. Immunol.*, 1938, **35**, 121.
- [5] GRABAR (P.) and WILLIAMS (C. A.). *Biochim. biophys. Acta*, 1953, **40**, 193.

- [6] HARRISON (P. M.) and HOFMANN (T.). *Bioch. J.*, 1961, **80**, 38.
- [7] HOOKER (S. B.) and FOLLENSBY (E. M.). *J. Immunol.*, 1934, **27**, 177.
- [8] HOTTE (G. A.) and PAPPENHEIMER (A. M.). *J. exp. Med.*, 1941, **74**, 545.
- [9] KONIKOV (A. P.) and KUSHKO (I. V.). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol., Immunol.*, 1957, **1**, 256.
- [10] KREJCI (L. E.), STOCK (A. H.), SANIGAR (E. B.) and KRAEMER (E. O.). *J. Biol. Chem.*, 1942, **142**, 785.
- [11] KUSHKO (I. V.). *5th international congress of biochemistry*, Moscou, 1961. Transactions of the plenary sessions and abstracts of papers. Pergamon Press, 1963, vol. 9.
- [12] MITRICA (N.), PLECEAS (P.) und MESROBEANU (L.). *Z. Immun. Allergforsch.*, 1965, **129**, 78.
- [13] MOORE (S.). *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, 235.
- [14] OAKLEY (C. L.) and FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.
- [15] RANE (L.) and WYMAN (L.). *J. Immunol.*, 1937, **32**, 321.
- [16] RAYNAUD (M.), BIZZINI (B.) et RELYVELD (E. G.). *Bull. Soc. chim. biol.*, 1965, **47**, 261.
- [17] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. G.), TURPIN (A.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 60.
- [18] RELYVELD (E. H.). *Études sur la toxine et l'antitoxine diphtériques. Thèse de Sciences*, Paris, 1958. Hermann, Paris, 1960.
- [19] SPACKMAN (D. H.), STEIN (W. H.) and MOORE (S.). *Analyst. Chem.*, 1958, **30**, 1190.
- [20] STOCK (A. H.). *J. Immunol.*, 1939, **36**, 489.
- [21] STOCK (A. H.) et VERNEY (E.). *J. Immunol.*, 1952, **69**, 373.
- [22] STOCK (A. H.) et LYNN (R. J.). *J. Immunol.*, 1961, **86**, 561.
- [23] TESSIER (P.) et COSTE (F.). *Physiopathologie de la scarlatine*. Chastanier, Nîmes, 1929, 1 vol.
- [24] URIEL (J.). *Bull. Soc. chim. biol.*, 1966, **48**, 969.
- [25] VAN DER SCHEER (J.) and WYCKOFF (R. W. G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1940, **43**, 427.
- [26] WEIR (R. C.) and PORTER (R. R.). *Biochem. J.*, 1966, **100**, 63.
- [27] YPHANTIS (D. A.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, **88**, 586.

Imprimé par l'Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette à Paris (France).
Printed in France. (71322)
